

強固な結晶性構造多糖・キチンの酵素分解機構の解明

渡邊 剛志

新潟大学 農学部

研究の目的

キチンは、真菌類・藻類・甲殻類・昆虫・軟体動物をはじめ多種多様な生物に存在し、構造多糖として重要な役割を果たしている。その生産量はセルロースに匹敵するといわれ、またキチンとその誘導体は様々な分野への利用の可能性を秘めている。しかし、キチンそのものは強固な結晶性多糖であるため酵素分解が困難である。結晶性キチン分解機構の解明は、この未利用バイオマス資源の活用のためばかりでなく、キチン分解を介した様々な生物学的プロセスの理解とその応用に必須である。筆者らは最近、高速原子間力顕微鏡を用いて結晶性キチン表面を分解しながら高速移動するキチン分解酵素分子を捉えることに成功し¹⁾、先に提案した

「細菌キチナーゼによる結晶性β-キチンのプロセッシブ(連続的)な分解モデル²⁾」の基本的なコンセプトを実証した。そこで本研究では、キチナーゼ高生産菌である *Serratia marcescens* 2170 のキチン分解酵素であるキチナーゼ A (ChiA) およびキチナーゼ B (ChiB) と、キチン分解促進

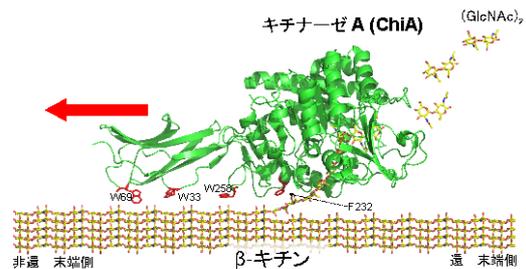


図 1. 結晶性キチンのプロセッシブな分解モデル

タンパク質である CBP21 を用いて、①結晶性β-キチン分解におけるキチナーゼの局所構造の機能解明、②細菌の結晶性キチン分解利用および生理機能発現におけるキチン分解促進蛋白質 CBP21 の重要性の解明を試みた。

方法：

①結晶性β-キチン分解におけるキチナーゼの局所構造の機能解明

結晶性キチン分解において、キチナーゼ分子表面および基質結合クレフト内部の芳香族アミノ酸残基が重要な役割を果たしている。その機能の詳細を解明するために、*S. marcescens* の ChiA および ChiB の分子表面、および基質結合クレフト内部の芳香族アミノ酸残基を、部位特異的変異により他のアミノ酸残基に置換し、その影響を酵素化学的・生化学的手法と、高速原子間力顕微鏡を併用して解析した。

②細菌の結晶性キチン分解利用および生理機能発現におけるキチン分解促進蛋白質 CBP21 の重要性解明

最近、*S. marcescens* のキチン結合タンパク質 CBP21 が、還元剤存在下でキチナーゼによるキチン分解を促進することが明らかにされた。キチン分解細菌の多くが類似の

蛋白質を持ち、キチン分解酵素系の主要メンバーの一つと言って良い状況になって来た。CBP21は酸化酵素の一種で(多糖モノオキシゲナーゼ、LPMO)、キチン表面のキチン鎖を酸化分解し、キチナーゼがアタックできる新たな末端を作り出すことによってキチン分解を促進すると考えられている。このCBP21の、細菌のキチン分解利用や、生理機能発現における重要性を調査するため、*S. marcescens* 2170株のCBP21遺伝子の欠損株を作成し、CBP21欠損の影響を、異なる形状のキチンを用いて、菌の生育、キチンの消失、キチナーゼ生産など様々な角度から分析した。また、キチン分解が重要な役割を果たすと考えられる昆虫病原性への影響を、カイコを用いた病原菌感染モデルを用いて評価した。

結果

①結晶性 β -キチン分解におけるキチナーゼの局所構造の機能解明

キチン分解酵素分子表面の芳香族アミノ酸残基の重要性と機能を解明するために、ChiB分子表面に存在する4つの芳香族アミノ酸残基のうち、基質結合クレフトに最も近いTyr240と、最も遠いTyr481に着目し、それぞれをTrpに置換し、その影響を高結晶性 β -キチンを用いて分析した。その結果、いずれの変異酵素もキチンへの結合活性は同等であったが、Tyr240の変異がTyr481変異酵素よりもずっと大きく分解活性を低下させた。このことから、分子表面にある同種の芳香族アミノ酸残基でありながら、結晶性キチン分解における役割が明らかに異なり、Tyr240はキチン鎖を基質結合クレフト内部に誘導する役割を持つことが示唆された³⁾。

一方、基質結合クレフト内部の芳香族アミノ酸残基の機能を解明するために、ChiAのマイナス3サブサイトに位置するTrp167に着目し、Tyrに置換した。この変異により、高結晶性 β -キチンの分解活性は顕著に低下したが、GlcNAc 6糖の結合に関する熱力学量に優位な変化は観察されず、Trp167のTyrへの変異は、長鎖のキチン鎖の触媒部位方向へのスライディングに影響している可能性が示唆された。

②細菌の結晶性キチン分解利用および生理機能発現におけるにおけるキチン分解促進蛋白質CBP21の重要性解明

CBP21の欠損株は、高結晶性 β -キチン微小繊維を分散した寒天培地上に、野生株よりも顕著に小さく不明瞭な溶解ゾーンを形成し、高結晶性 β -キチンの分解と利用にCBP21が非常に重要であることが示された。さらに、CBP21の欠損は、微粉末化したキチンに比べて、カニ殻から調製されたフレイク状のキチンの分解利用を顕著に低下させた。これらの結果から、より天然に近いキチンの分解利用にCBP21が特に重要であることがわかった。また、*in vitro*ではCBP21のキチン分解促進にアスコルビン酸のような補助因子が必要とされるが、*S. marcescens*

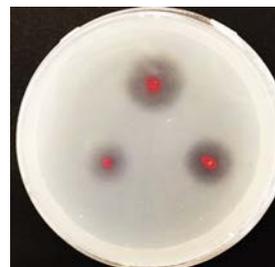


図2. 野生株(上)、CBP欠損株(左下)、補完株(右下)のキチン溶解ゾーン

の培養上清にはこの菌自身が生産する分解促進補助因子が存在する可能性が示唆された。一方、予想に反して昆虫病原性への影響は観察されなかった。

結論

結晶性キチンのプロセッシブ（連続的）な分解には、キチン分解酵素の分子表面や基質結合クレフト内部の芳香族アミノ酸残基が非常に重要な役割を果たすが、それらの芳香族アミノ酸残基の機能は一様ではなく、その位置と種類によって、固有の特徴的な役割を果たしていることが明らかになってきた。CBP21 は、このような巧妙な仕組みと構造を有するキチン分解酵素によるキチン分解を促進する。今回の研究によって、より天然に近いキチンの分解利用により効果を発揮することがわかり、地球上で膨大な量生産されるキチンの、細菌による分解利用、生態系におけるキチン循環に決定的に重要な役割を果たしているタンパク質であると考えられる。

文献

- 1) Igarashi, K., Uchihashi, T., Uchiyama, T., Sugimoto, H., Wada, M., Suzuki, K., Sakuda, S., Ando, T., Watanabe, T., and Samejima, M. (2014) Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin. *Nature Communications*. 5, Article number: 3975.
- 2) Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., and Watanabe, T. (2001) Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. *J. Biol. Chem.* 276(44):41343-41349.
- 3) Sugimoto, H., Nakamura, K., Nishino, Y., Idezawa, Y., Fujinuma, Y., Suzuki, K., and Watanabe, T. (2016) Differences in the roles of the two surface-exposed tyrosine residues, Y240 and Y481, of *Serratia marcescens* chitinase B during processive degradation of crystalline chitin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61:255-261.